

STRUKTUR DAN FUNGSI EKSOPOLISAKARIDA DALAM SIMBIOSIS LEGUM-RHIZOBIUM

Cecep Hidayat

Jurusan Agroteknologi, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Sunan Gunung

Djati Bandung

cephidayat62@uinsgd.ac.id

Abstrak

Rhizobia memproduksi eksopolisakarida (EPS) untuk pembentukan nodul pemfiksasi nitrogen pada tipe nodul-legum indeterminate. EPS berperan dalam invasi dan perkembangan nodul, pelepasan bakteri dari benang infeksi, perkembangan bakteroid, dan penekanan terhadap respons pertahanan tanaman dan perlindungan terhadap senyawa anti microbial tanaman. Sintesis dikontrol oleh gen-gen *exo*, *exs*, *exp*, atau *pss* yang terdapat pada megaplasmid rhizobia atau kromosom. Eksopolisakarida rhizobia merupakan polimer heteropolisakarida spesifik spesies yang mengandung gula yang dapat disubstitusi dengan sisa non-karbohidrat dan terdiri dari unit ulangan tujuh sampai sembilan sisa heksosa. Succinoglycan (EPS I) dan galactoglucan (EPS II) merupakan EPS rhizobia yang memiliki struktur dan sintesis berbeda. Succinoglycan tersusun dari unit berulang octasaccharida yang berisi satu galaktosa dan sisa tujuh glukosa dan digabungkan oleh ikatan β -1,3, β -1,4 dan

β -1, 6 glycosidic dan . Galactoglucan merupakan polimer unit berulang disakarida dengan ikatan α -1,3 dan β -1,3 glycosidic EPS I disintesis pada kondisi normal, sedangkan EPS II disintesis pada saat kekurangan P atau terjadi mutasi pengatur gen mucR atau expR. EPS I dan II disekresikan kedalam fraksi utama dengan dua sub unit polimerisasi berbeda, yaitu : 1) yang memiliki berat molekul tinggi (HMW) dan 2) yang memiliki berat molekul rendah (LMW).

Pada mutan defisien EPS pembengkokan rambut akar dan pembentukan benang infeksi dapat terus berjalan dengan bantuan penambahan LMW EPS dan koinokulasi. Keberhasilan koinokulasi bergantung pada kemampuan strain rhizobia dalam menghasilkan EPS identik dan struktur kimia yang sama, serta memiliki jumlah pasangan EPS⁻ Nod⁺ dan EPS⁺Nod⁻ sama.

Kata kunci : EPS, succinoglycan, galactoglucan, koinokulasi, rhizobium

Pendahuluan

Pada kondisi nitrogen terbatas, bakteri gram-negative tanah *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, dan *Azorhizobium* membentuk simbiosis dengan tanaman leguminosae dalam bentuk nodul akar. Nodul akar adalah organ berisi sel tanaman yang terinfeksi bakteroid yang menyumbang tanaman dengan N-terfiksasi. Nodul yang terbentuk pada tanaman inang terdiri dari dua tipe, yaitu *determinate* dan *indeterminate*. Tanaman legum beriklim sedang seperti semanggi, pea, atau alfalfa membentuk nodul *indeterminate* dengan ciri nodul silindris dan terdapat *apical meristem* *persisten* yang bertanggung jawab terhadap pertumbuhan nodul. Tanaman legum

tropis seperti kedelai dan kacang-kacangan lain membentuk nodul *determinate* berbentuk bola dan *meristem* tidak *persisten*. Perkembangan nodul memerlukan sintesis dan persepsi sinyal molekuler seperti lipochito oligosakarida yang disebut faktor Nod yang berperan dalam induksi pembentukan nodul. Faktor Nod berperan dalam deformasi akar rambut (Had^+ , Hac^+), pembentukan benang infeksi (Thr^+) dan aktivasi pembelahan sel korteks. Polisakarida permukaan dari bakteri juga krusial bagi keberhasilan simbiosis dengan tanaman legume.

Kebanyakan rhizobia memproduksi beragam polisakarida, yang diduga berperan dalam interaksi tanaman-bakteri (Gonzalez dan Marketon, 2003). Biosintesis ekso-polisakarida (EPS) oleh

rhizobia diperlukan untuk pembentukan nodul pemfiksasi nitrogen pada tipe nodul-legum *indeterminate* seperti *Leucaena*, *Medicago*, *Pisum*, *Trifolium*, dan *Vicia* spp. EPS terlibat dalam invasi dan perkembangan nodul, pelepasan bakteri dari benang infeksi, perkembangan bakteroid, dan penekanan terhadap respons pertahanan tanaman dan perlindungan terhadap senyawa anti microbial tanaman.

Eksopolisakarida rhizobia merupakan polimer heteropolisakarida spesifik spesies yang mengandung gula yang dapat disubstitusi dengan sisa non-karbohidrat. Sintesis unit ulangan eksopolisakarida, modifikasi, polimerisasi dan ekspor ke permukaan sel dikontrol oleh

sekelompok gen-gen yang disebut *exo*, *exs*, *exp*, atau *pss* yang terdapat pada megaplasmid rhizobia atau kromosom. Sementara produksi EPS dipengaruhi oleh sejumlah faktor-faktor lingkungan seperti fosfat, nitrogen, dan sulfur.

Struktur dan Fungsi

Eksopolisakarida Rhizobia

Rhizobia adalah bacteria gram-negatif dengan cytoplasmic dan membrane luar yang melingkuni ruang periplasmic. Komposisi permukaan luar ini tersusun dari polisakarida, yang terbagi dalam tiga kelompok, yaitu : 1) lipopolisakarida (LPS), polisakarida kapsul (CPS), dan polisakarida acidic (EPS). Polisakarida permukaan rhizobia

mengikat lektin yang dikeluarkan tanaman inang (Hirsch, 1999).

Eksopolisakarida rhizoba merupakan heteropolisakarida yang terdiri dari unit-unit berulang. Senyawa ini disekresikan ke lingkungan (EPS) atau tinggal pada permukaan bakteri sebagai polisakarida kapsul (CPS). Keragaman struktur kimia EPS dalam hal komposisi gula dan keterkaitan dengan sub unit tunggal, ukuran unit ulangan dan tingkat polimerisasi ditemukan diantara rhizobia.

EPS merupakan heteropolimer kompleks dengan berat molekul tinggi dan unit ulangan berkisar dari tujuh sampai sembilan sisa heksosa. Pengikat glycosidic dapat berupa alpha, beta linear, atau percabangan dengan rantai samping

dan umumnya bahan non karbohidrat seperti succinate, pyruvate atau acetate dan acidic alami yang terkait dengan kehadiran asam uronic, pyruvate ketals dan succinate.

EPS rhizobia yang banyak dikenal adalah succinoglycan (EPS I) yang dihasilkan oleh beberapa strain *S. meliloti*. Succinoglycan tersusun dari unit berulang octasaccharida yang berisi satu galaktosa dan sisa tujuh glukosa dan digabungkan oleh ikatan β -1,3, β -1,4 dan β -1, 6 glycosidic. *S. meliloti* juga menghasilkan eksopolisakarida lain yaitu galactoglucan (EPS II). EPS II hanya disintesis di bawah kondisi kekurangan fosfat atau apabila terjadi mutasi salah satu pengatur gen mucR atau expR (Skorupska *et al* , 2006).

Strukturnya berbeda dengan EPS I, yaitu merupakan polimer unit berulang disakarida dengan ikatan α -1,3 dan β -1,3 glycosidic. EPS I dan II disekresikan kedalam fraksi utama dengan dua sub unit polimerisasi berbeda, yaitu: 1) yang memiliki berat molekul tinggi (HMW), berisi ratusan sampai ribuan unit ulangan, dan 2) yang memiliki berat molekul rendah (LMW) yang mencerminkan monomer, dimer dan trimer pada EPS I. Louch dan Miller (2001) menemukan adanya LMW EPS pada *B. japonicum*. Bentuk LMW EPS yang diproduksi *S. meliloti* dapat membentuk nodul alfalfa, namun perlu studi lebih lanjut apakah LMW EPS ini mampu membentuk nodul pada tanaman kedelai. Menurut Battisti *et al* (1992) LMW succinoglycan kemungkinan

berfungsi sebagai sinyal spesifik sebagaimana sinyal pembentukan nodul nodRm1. Fraysse *et al* (2003) dengan mengamati mutan *exo Y* menyimpulkan succinoglycan tidak diperlukan *S. meliloti* untuk mengkolonisasi pembengkakan rambut akar atau untuk menginduksi benang infeksi, namun diperlukan untuk pemanjangan benang infeksi pada sel nodul.

Pengaturan Biosintesis dan Koinokulasi Ekspolisakarida

Gen *exo*, *exs*, dan *pss* yang terdapat berkelompok dalam kromosom atau megaplasmid mengatur biosintesis ekspolisakarida. Biosintesis ekspolisakarida terdiri dari beberapa langkah proses dan

tergantung pada aktivitas kompleks protein yang berlokasi di membrane bagian dalam (IM) dan bagian luar (EM). Prekursor, gula- difosfo nukleotida ditransfer ke rantai polisakarida atau tepatnya ke akseptor tempat aktivitas spesifik glycosyltransferase. Pada heteropolysakarida undecaprenol difosfat bertindak sebagai akseptor (Skorupska *et al*, 2006).

Biosintesis eksopolisakarida pada *Rhizobium* merupakan proses komplek yang diatur di tingkat transkripsi dan pasca translasi serta dipengaruhi oleh berbagai faktor lingkungan.

Pada biosintesis succinoglycan gen pengatur kromosom *exoR* dan *exoS* mengurangi pembentukannya dan sebaliknya mutan *exoR* dan *exoS*

memproduksi succinoglycan berlebihan. Sintesis EPS I dipengaruhi secara kuat oleh peningkatan defisiensi ammonia melalui pengaturan system pengkodean oleh *exoR* dan *exoS*. *ExoR* rupanya terlibat langsung dalam merespons nitrogen, sebab sintesis EPS I pada mutan *exoR* tidak bergantung pada kehadiran ammonia dalam medium. Sintesis EPS I dalam jumlah besar terjadi di bawah kondisi normal, sementara produksi EPS II terjadi pada saat kekurangan fosfat atau mutasi pengatur gen *expR* atau *mucR*. Kedua gen ini mengatur biosintesis galactoglucan secara negative. Mutan *expR* mensintesis simbiotik secara aktif HMW dan LMW EPS II, sedangkan mutan *mucR* menghasilkan simbiotik inaktif

HMW EPS II. Protenin expR merupakan anggota keluarga protein LuxR, dimana kebanyakan bertindak sebagai reseptor N-acylhomoserine lactones (AHLs) dan termasuk pada pengatur transkripsi yang terlibat dalam ekspresi gen.

Pengikatan bakteri oleh akar tanaman legume dibedakan dalam dua tahap. Pengikatan tahap awal berjalan setelah adanya pengenalan lektin rambut akar oleh spesifik karbohidrat permukaan dari rhizobia. EPS akan meningkatkan pengikatan bakteri ke bagian ujung rambut akar yang tumbuh dan penting untuk infeksi epidermis rambut akar. Defisiensi selulosa menurunkan penggumpalan strain Exo sehingga infeksi berlangsung. Defisiensi EPS menyebabkan kenaikan penggumpalan bakteri

yang berakibat pada penghambatan pemanjangan benang infeksi dan kolonisasi nodul.

Produksi EPS oleh rhizobia yang bersimbiosis dengan tanaman legume seperti *Vicia*, *Medicago*, *Pisum* atau *Trifolium*, diperlukan untuk pembengkokan rambut akar, pembentukan benang infeksi, pelepasan bakteri, perkembangan bakteroid dan efektifitas nodulasi. Pembengkokan rambut akar dan pembentukan benang infeksi bisa berlangsung pada mutan defisien EPS dengan penambahan sejumlah kecil fraksi LMW EPS. Kemudian, koinokulasi mutan Exo dengan strain isogenic Nod⁻Exo⁺ dapat mempertahankan proses invasi nodul. Nodulasi defisiensi mutan Exo dari *Rhizobium* sp. NGR234, *S. meliloti*, atau *R. leguminosarum*

dapat diperbaiki oleh koinokulasi dengan isogenic non nodulasi tetapi memproduksi EPS. Laus *et al* (2005) menyatakan koinokulasi akar *V. sativa* dengan RBL 5833 dan heterologous berbeda memperlihatkan jumlah nodul tertinggi berturut-turut RBL 5045, ANU 845+5833, dan CIAT 899+5833. Pembentukan benang infeksi dapat diperbaiki sepenuhnya melalui koinokulasi dengan strain tetua LPR 5045- plasmid Sym, *R. leguminosarum* bv. *Trifolii* ANU 845, dan *R. tropici* CIAT 899. Koinokulasi akar dengan *S.meliloti* RCR 2011, *S. meliloti* GM 1766, dan *A. tumefaciens* LBA 4301 menghasilkan benang infeksi yang gagal . Pembentukan benang infeksi juga tidak dapat

diperbaiki dengan koinokulasi dengan *Rhizobium* strain NGR 234 sebagai turunan ANU 280 atau strain ANU 265. Nodul hanya terbentuk pada akar yang dikoinokulasi dengan *R.leguminosarum* LPR 5045 dan ANU 845 yang menghasilkan EPS identik, dan *R tropici* CIAT 899 yang menghasilkan EPS identik sebagian. Uraian tersebut menunjukkan kebutuhan structural EPS rhizobia untuk mencapai keberhasilan simbiosis. Struktur EPS juga yang menentukan infeksi spesifik tanaman inang.

Van Workum *et al* (1998) melakukan koinokulasi dengan RBL 5522 sebagai strain isoenic EPS⁺ Nod⁻, untuk mendapatkan rasio optimal EPS⁻ Nod⁺ dan EPS⁺ Nod⁻. Hasilnya menunjukkan mutan pssDIII akan diperbaiki secara efektif apabila pasangan koinokulasi hadir dalam jumlah berlebih. Koinokulasi dengan *R. leguminosarum* bv. Trifolii ANU 843, yang mensintesis EPS dengan unit ulangan octasakarida sama menunjukkan hasil berbeda. Meskipun strain ini mampu memperbaiki kemampuan nodulasi dari mutan pssDIII,

persentase tanaman bernodul dan rata-rata jumlah nodul lebih kecil dibandingkan dengan yang diinokulasi dengan strain RBL 5522. Koinokulasi akan lebih berhasil bila terdapat jumlah pasangan EPS⁻ Nod⁺ dan EPS⁺Nod⁻ sama. Koinokulasi memperlihatkan hasil sama seperti yang ditunjukkan oleh ANU 843 dan ANU 453 yang mendapatkan Nod⁺ dan Nod⁻ dari *R. etli* CE 3, yang menghasilkan EPS dengan struktur kimia sama.

Fraysse *et al* (2003) mengemukakan, penemuan menarik pada era 1990-an yaitu adanya perbedaan persepsi EPS berdasarkan ontogeny nodul (determinate dan indeterminate), memerlukan

eksopolisakarida berbeda. Acidic EPS tampak berperan penting dalam simbiosis pemfiksasi nitrogen dengan tanaman legume yang memiliki tipe nodul indeterminate seperti *S. meliloti*/alfalfa, *Rhizobium leguminosarum* bv. Viciae/Vicia sativa dan bv. Trifolium/trifolium ssp. NGR 234/Leucaena. Namun peran acidic EPS dalam simbiosis tidak berlaku untuk tipe nodul determinate *S. fredii*/Glycine max, *R. leguminosarum* bv. Phaseoli/Phaseolus. Perbedaan tersebut terjadi karena LPSs dapat menyempurnakan defisiensi EPS pada pembentukan nodul determinate. Kemungkinan lain adalah pada nodul tipe indeterminate bacteria harus menyebar melalui cara penetrasi benang infeksi secara kontinu pada

sel koteks akar baru, sementara pada tipe nodul determinate, bacteria menyebar melalui pembelahan dari sel yang terinfeksi.

Kesimpulan

1. Nodulasi tipe nodul- legume indeterminate memerlukan EPS yang diproduksi rhizobia. struktur kimia yang sama, serta memiliki jumlah pasangan EPS⁻ Nod⁺ dan EPS⁺Nod⁻ sama.
2. Succinoglycan (EPS I) dan galactoglucan (EPS II) merupakan EPS rhizobia yang memiliki struktur dan sintesis berbeda. EPS I disintesis pada kondisi normal, sedangkan EPS II disintesis pada saat kekurangan P atau terjadi mutasi pengatur gen mucR atau expR.
3. Pembengkokan rambut akar dan pembentukan benang infeksi pada mutan defisien EPS dapat diperbaiki dengan penambahan sedikit LMW EPS dan koinokulasi .
4. Keberhasilan koinokulasi bergantung pada kemampuan strain rhizobia dalam menghasilkan EPS identik dan

- symbiosis Eur. J. Biochem. 270 : 1365–1380
- Battisti, Laurie, Jimmie C. Lara, and John A. Leigh. 1992. Specific oligosaccharide form of the *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide promotes nodule invasion in alfalfa. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 89 : 5625-5629.
- Gonzalez , Juan E. and Melanie M. Marketon. 2003. Quorum Sensing in Nitrogen-Fixing Rhizobia. Microbiology and Molecular Biology Reviews: 574–592
- Hirsch, M. Ann. 1999. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legum nodulation. Current Opinion in Plant Biology 2:320–326
- Frayse , Nicolas., Francois Couderc and Verena Poinso. 2003. Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium–legume

- Laus, Marc C., Anton A. N. van Brussel, and Jan W. Kijne. 2005. Exopolysaccharide Structure Is Not a Determinant of Host-Plant Specificity in Nodulation of *Vicia sativa* Roots. MPMI Vol. 18, No. 11, 2005, pp. 1123–1129. DOI: 10.1094/MPMI -18-1123.
- Louch, Heather A and Karen J. Miller. 2001. Synthesis of a Low-Molecular-Weight Form of Exopolysaccharide by *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. Applied and Environmental Microbiology Vol. 67, No. 2 : 1011–1014.
- Skorupska, Anna., Monika Janczarek, Małgorzata Marczak, Andrzej Mazur and Jarosław Król. 2006. Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microbial Cell Factories* 2006, **5**:1-19.
- van Workum , Wilbert A. T., Sophie van Slageren,

Anton A. N. van Brussel,
and Jan W. Kijne. 1998.
Role of
Exopolysaccharides of
Rhizobium leguminosarum
bv. viciae as Host Plant-
Specific Molecules
Required for Infection
Thread Formation During
Nodulation of Vicia sativa.
MPMI Vol. 11, No. 12
:1233–1241.